

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie

Doktorský studijní program: Biochemie
Autoreferát disertační práce



Studium membránových interakcí pomocí
pokročilých fluorescenčních technik:
Od iontů k makromolekulám

Šárka Pokorná

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.
Školitel-konzultant: Prof. Dr. Martin Hof, DSc.

Praha, 2016

Table of Contents

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Seznam zkratk | 4 |
| Abstrakt..... | 5 |
| 1. Úvod..... | 7 |
| 2. Cíle práce | 8 |
| 3. Vliv iontů na modelové fosfolipidové membrány | 9 |
| 3.1 Mobilita a hydratace membrány na přesně definované úrovni je určena metodou časově rozlišených posuvů fluorescence | 9 |
| 3.2 Interakce jednovazných solí s kladně nabitými lipidovými dvojvrstvami | 9 |
| 3.3 Komplexní charakter interakcí vápenatých iontů s elektrostaticky neutrálními a záporně nabitými fosfolipidovými membránami | 10 |
| 4. Mechanismus fúze vesikul..... | 11 |
| 4.1 Techniky využívající konfokální mikroskop | 11 |
| Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS) | 11 |
| Försterův rezonanční přenos energie (FRET)..... | 11 |
| 4.2 Komplementární lipopetidy CP ₁₂ E ₄ a CP ₁₂ K ₄ indukují fúzi lipidových membrán: molekulární mechanismus jejich interakce s membránou | 12 |
| 5. Vznik pórů, vytvořených proteinem Bax, v membráně mitochondrií | 13 |
| 5.1 Zkoušky průsaku fluorescenčního barviva | 13 |
| 5.2 Oxidovaný fosfolipid PazePC usnadňuje tvorbu Bax pórů v modelových mitochondriálních membránách | 13 |
| Abstract..... | 16 |
| 1. Introduction..... | 17 |
| 2. Aims of the study | 18 |
| 3. Ionic effects at membrane/water interface | 19 |
| 3.1 Time dependent fluorescence shift method determines membrane mobility and hydration at defined bilayer depth..... | 19 |
| 3.2 Interactions of monovalent salts with cationic lipid bilayers | 19 |
| 3.3 The complex nature of calcium cation interactions with zwitterionic and anionic phospholipid membranes | 20 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4. Mechanism of vesicle fusion | 21 |
| 4.1 Confocal fluorescence microscopy techniques | 21 |
| Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) | 21 |
| Förster resonance energy transfer (FRET) | 21 |
| 4.2 Complementary lipopeptides CPE and CPK induce fusion of lipid membranes: molecular mechanism of lipopeptide – membrane interaction | 22 |
| 5. Fluorescence leakage assay reveals membrane pore formation by Bax protein | 23 |
| 5.1 Fluorescence leakage assays | 23 |
| 5.2 The oxidized phospholipid PazePC promotes Bax ability to induce pores in mitochondrial membranes | 23 |
| References | 25 |
| Curriculum vitae | 27 |
| List of publications | 29 |

Seznam zkratek

| | |
|--------|------------------------------------------------------------------------------|
| ACF | Autokorelační funkce/ Autocorrelation function |
| Bax | Bcl-2 asociovaný X protein |
| Bcl-2 | B-cell CLL/lymphoma 2 |
| DLS | Dynamický rozptyl světla/Dynamic light scattering |
| DOPC | 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholín |
| DOTAP | 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propan |
| FCS | Fluorescenční korelační spektroskopie/ Fluorescence correlation spectroscopy |
| FRET | Försterův rezonanční přenos energie/ Förster resonance energy transfer |
| GUVs | Obří jednovrstvé vesikuly/ Giant unilamellar vesicles |
| LUVs | Velké jednovrstvé vesikuly/ Large unilamellar vesicles |
| OxPIs | Oxidované fosfolipidy/ Oxidized phospholipids |
| PazePC | 1-palmitoyl-2-azelaoyl-sn-glycero-3-phosphocholine |
| PC | phosphatidylcholine |
| PS | phosphatidylserine |
| TDFS | Časově rozlišený posuv fluorescence/ Time dependent fluorescence shift |

Abstrakt

Pokročilé fluorescenční techniky byly využity ke studiu tří různých projektů týkajících se biologických membrán a jejich interakcí. Následující práce je tedy rozdělena do tří samostatných kapitol, z nichž každá pojednává o jednom tématu.

1) Vliv iontů na modelové lipidové membrány byl osvětlen experimentálně metodou časově rozlišených posuvů fluorescence (TDFS, time dependent fluorescence shifts) a teoreticky pomocí molekulárně-dynamických simulací. Kombinace těchto dvou přístupů je vhodná k určení zásadních vlastností membrán jako je pohyblivost a hydratace konkrétní části membrány, uspořádání lipidové dvojvrstvy nebo vazebná místa iontů. Anionty ClO_4^- , Br^- , Cl^- a F^- , reprezentující Hofmeisterovu řadu, mají tendenci specificky interagovat s kladně nabitými molekulami lipidů v dvojvrstvě, což má vliv na uspořádání membrány. Změny pozorovaných parametrů odpovídají řazení Hofmeisterovy serie iontů. Účinky iontů jsou jak důsledkem přímé interakce iont-lipid, tak zprostředkovány nepřímo, tzn. pozměněním struktury vody v bezprostřední blízkosti molekuly iontu.

Další práce, týkající se vápenatých iontů, prokázala, že Ca^{2+} mají afinitu jak k elektrostaticky neutrálním tak k záporně nabitým fosfolipidovým membránám, vazba iontů ovlivňuje organizaci membrány. Bylo identifikováno několik vazebných míst pro vápník, která se mění v závislosti na jeho koncentraci.

2) Dva komplementární lipopeptidy, CP_{12}K_4 a CP_{12}E_4 , inkorporované do dvou různých lipidových membrán slouží jako minimalistický modelový aparát vyvolávající fúzi těchto membrán. Použitím technik FCS a FRET bylo zjištěno, že oba lipopeptidy se v membráně chovají rozdílně. Přítomnost CP_{12}K_4 v membráně zpomaluje pohyb lipidových molekul, laterálně komprimuje membránu a ve vyšších koncentracích klastruje. Navíc, peptidová část molekuly, K_4 , má tendenci zanořovat se lipidové dvojvrstvy. Nic z toho nebylo pozorováno pro druhý lipopeptid CP_{12}E_4 . Dále byl nastíněn možný průběh první fáze fúze, tedy vazba peptidu K_4 na vezikuly obsahující CP_{12}E_4 . Porozumění chování molekul lipopeptidu v membráně a pochopení mechanismu fúze může pomoci při konstrukci účinného a specifického modelu použitelného pro *in vivo* aplikace, jako je například cílený transport léčiv.

3) Vnitřní apoptotická dráha je těsně spjata s vnější mitochondriální membránou. O životě a smrti zde rozhoduje rodina proteinů Bcl-2. Protein Bax (člen Bcl-2 rodiny) se po aktivaci zanořuje do vnější mitochondriální membrány, oligomerizuje a tvoří póry. Vliv oxidačního

stresu, který byl simulován přidavkem oxidovaného fosfolipidu do modelových mitochondriálních membrán, na účinek proteinu Bax byl sledován pomocí metod průsaku fluorescenčního barviva. Přítomnost oxidovaného fosfolipidu PazePC v lipidové membráně zvyšuje rychlost úniku barviva skrz membránu zatímco frakce proteklých vezikul se nemění. Vlivem oxidačního stresu jsou póry v membránách obsahujících PazePC větší než v těch bez oxidovaného lipidu, jejich velikost však stále není dostatečná k propagaci apoptotického signálu.

1. Úvod

Pořádek a organizace je v živých organismech udržována pomocí bariér – biologických membrán. Membrány ohraničují orgány i buňky a udržují nerovnováhu jejich vnitřního a vnějšího prostředí. Mimo tuto svou pasivní roli se také aktivně podílejí na komunikaci s okolním prostředím, zajišťují transport materiálu nebo slouží jako platforma pro výrobu energie. Všechny tyto procesy jsou zajišťovány vzájemným působením membrán a okolních látek.

Základní strukturu biologických membrán tvoří amfifilní lipidové molekuly, které se ve vodném prostředí samovolně uspořádají do dvojvrstvy. Hydrofobní uhlovodíky, z velké většiny řetězce mastných kyselin, protějších molekul formují vnitřek membrány, hydrofilní hlavičky jsou orientovány po vnějších stranách a obklopeny molekulami vody. Proteiny, které jsou integrální součástí membrány, jsou podobně jako lipidy složeny z hydrofobních transmembránových domén a hydrofilních částí vně membrány. Singer a Nicholson, kteří přišli v roce 1972 se svým slavným modelem tekuté mozaiky¹, popsali biologickou membránu jako dvourozměrnou kapalinu umožňující molekulám volnou difúzi.

Realné biologické membrány jsou velmi komplexní systémy, jejichž složení je nemožné kontrolovat bez ztráty jejich integrity. Proto se mnohdy dává přednost membránám modelovým, tzn. uměle vytvořeným. Vesikuly reprezentující volně stojící lipidové dvojvrstvy lze rozdělit dle jejich velikostí. Velké jednovrstvé vesikuly (large unilamellar vesicles – LUVs) mají poloměr v rozmezí cca 50–1000 nm a jsou vhodné pro experimenty v roztoku. Obří vesikuly (giant unilamellar vesicles – GUVs) svou velikostí připomínají buňky, $d = 10\text{--}100\text{ }\mu\text{m}$, díky svým rozměrům jsou pozorovatelné pod mikroskopem a tudíž vhodné pro měření na jedné vesikule.

Metody využívající fluorescence zažívají v posledních letech velký zájem a to jak ve vývoji, tak v použití. V roce 2014 byla za objevy v superrozlišovací mikroskopii udělena Nobelova cena za chemii. Přes nutnost značení jsou fluorescenční metody široce využívány v biologickém, biochemickém i biofyzikálním výzkumu, především díky tomu, že jsou vysoce citlivé a málo invazivní. Pomocí těchto technik lze získat informace jak obecné, například o celkové mobilitě a hydrataci membrán, tak detailní pohled na úrovni několika molekul (agregace, vzdálenost molekul).

V rámci této práce jsou představeny tři různá témata týkající se biologických membrán a jejich interakcí. Vzhledem k tomu, že jednotlivá témata i metody použité k jejich studiu jsou

značně rozdílné, je následující text rozdělen do tří částí. Každá z nich obsahuje stručný popis použitých metod, úvod k danému tématu a přehled výsledků podpořených diskuzí.

2. Cíle práce

Cílem této práce je přispět k porozumění procesů odehrávajících se ve spojení s biologickými membránami. V rámci představované disertační práce byla studována tři rozdílná témata jejichž hlavní cíle jsou následující:

1) Spojením TDFS experimentů a MD simulací popsat vliv iontů na modelové membrány. Tato část práce se zaměřuje konkrétně na to, kam se ionty váží a jak ovlivňují organizaci lipidové dvojvrstvy.

2) Lipopeptidy CP₁₂E₄ a CP₁₂K₄ inkorporované do dvou různých lipidových membrán dokáží vyvolat fúzi těchto membrán. V tomto bodě práce je cílem charakterizovat molekulární mechanismus fúze se zaměřením na interakce i) lipopeptid-lipopeptid a ii) lipopeptid-membrána s použitím metod FCS a FRET.

3) Poslední kapitola se zabývá interakci proapoptotického proteinu Bax s modelovou mitochondriální membránou. Úkolem třetí části práce je popsat vliv oxidačního stresu na zásadní krok ve vnitřní apoptotické dráze, tvorbu pórů proteinem Bax ve vnější mitochondriální membráně, pomocí zkoušky průsakem fluorescenčního barviva.

3. Vliv iontů na modelové fosfolipidové membrány: metoda časově rozlišených posuvů fluorescence (TDFS)

3.1 Mobilita a hydratace membrány na přesně definované úrovni je určena metodou časově rozlišených posuvů fluorescence²

Pro účely měření metodou TDFS se využívají fluorescenční molekuly, které jsou citlivé na polaritu prostředí. Tyto sondy mají velký dipólový moment a jejich fluorescence je ovlivněna interakcí fluoroforu se sousedícími molekulami. Použití časově rozlišených měření umožňuje získat jak informaci o polaritě, tak o viskozitě bezprostředního okolí sondy. Polarita v lipidových dvojvrstvách se dramaticky mění v závislosti na poloze; od nepolárního prostředí uvnitř dvojvrstvy až po plně hydratované fosfolipidové hlavičky. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné znát polohu fluorescenční sondy uvnitř lipidové membrány. Sonda Laurdan je lokalizována na úrovni karbonylových skupin lipidů³, sonda Dtmac je zakotvena ještě trochu blíže k rozhraní lipidů a vody⁴. Obě molekuly monitorují oblast fosfolipidových hlaviček, kde mezi molekulami lipidů a vody vznikají vodíkové vazby, a proto polarita a viskozita prostředí odpovídá hydrataci a mobilitě membrány. Hydratace membrány je charakterizována celkovým spektrálním posuvem ($\Delta\nu$), mobilita relaxačním časem (τ).

3.2 Interakce jednovazných solí s kladně nabitými lipidovými dvojvrstvami (publikace I a II)

Interakce iontů s biomolekulami jsou často spojovány s Hofmeisterovým efektem. Více než před sto lety popsal Franz Hofmeister rozdílný vliv iontů na vysolování proteinů z roztoku a seřadil je dle síly jejich účinku.^{5,6} V průběhu let byl tento efekt mnohokrát pozorován, ovšem dodnes není uspokojivě vysvětlen. Původní teorie předpokládající vliv iontů na strukturu vody byla popřena zjištěním, že ionty mění strukturu vody pouze ve své bezprostřední blízkosti.^{7,8}

Kladně nabitě lipidy nejsou běžnou součástí biologických membrán. Syntetické kladně nabitě lipidy se, často v kombinaci s neutrálními lipidy⁹, používají v genové terapii. Záporně nabitá DNA interaguje s lipidy, které ji chrání a napomáhají jejímu transportu do buněk.^{10,11} Není pochyb, že tato interakce je ovlivněna přítomností okolních iontů.¹²

Vliv iontů byl studován na jednovrstvých vesikulách (large unilamellar vesicles – LUVs) tvořených elektrostaticky neutrálním lipidem dioleoyl-fosfatidylcholinem (DOPC), pro zesílení účinku aniontů byl do vesikul přimíchán kladně nabitý lipid dioleoyl-triamoniumpropan

(DOTAP). Soli běžně přítomné v živých organismech, NaCl a KCl, snižují mobilitu jak neutrálních, tak kladně nabitých modelových membrán. MD simulace ukázaly, že efekt v neutrálních membránách je způsoben vazbou kationtů přímo v membráně v oblasti fosfolipidových hlaviček. V případě kladně nabitých dvojstev se v blízkosti membránového povrchu tvoří vrstva chloridových aniontů, kompenzující náboj membrány.

Vliv studovaných iontů na parametry získané na základě měření časově rozlišených fluorescenčních posuvů, τ a $\Delta\nu$, Laurdanu odpovídají pořadí v Hofmeisterově sérii. Chloristan a bromid se váží v oblasti fosfolipidových hlaviček kladně nabitých membrán, klastrují jednotlivé molekuly lipidů, čímž výrazně snižují jejich mobilitu. V důsledku interakce bromidu s membránou obsahující pouze kladně nabité lipidy se na povrchu tvoří oddělené hydrofilní (bromid a kladně nabité hlavičky) a hydrofobní (odhalené řetězce mastných kyselin) oblasti. Chloridové ionty nevykazují dramatický vliv na mobilitu a hydrataci kladně nabitých membrán, měřené parametry jsou velmi podobné těm, které byly naměřeny pro membrány v čisté vodě. V přítomnosti fluoridových iontů se pohyblivost kladně nabitých membrán rapidně zvýší ve srovnání se vzorky měřenými ve vodě. Přesto, že fluoridy s membránou přímo neinteragují, díky kladnému náboji jsou anionty přitahovány blízko k povrchu membrány, kde rozrušují síť vodíkových vazeb tvořených molekulami lipidů a vody. Závěrem lze shrnout, že v rámci této práce byl pozorován hofmeisterův efekt; účinky iontů jsou jak důsledkem přímé interakce ion – lipid (ClO_4^- and Br^-), tak zprostředkovány nepřímou, tzn. pozměněním struktury vody v bezprostřední blízkosti molekuly iontu (F^-).

3.3 Komplexní charakter interakcí vápenatých iontů s elektrostaticky neutrálními a záporně nabitými fosfolipidovými membránami (paper III)

Vápenaté ionty se účastní řady pro organismy klíčových dějů jako je signalizace¹³, asociace proteinů s membránou^{14,15} nebo fúze membrán¹⁶. Z tohoto důvodu je porozumění molekulárnímu mechanismu interakce mezi Ca^{2+} ionty a membránou zásadní. Cílem prezentované práce bylo tyto interakce popsat pomocí kombinace spektroskopických metod a molekulárně dynamických simulací.

Metodou dynamického rozptylu světla (dynamic light scattering DLS) bylo zjištěno, že vápenaté ionty jsou schopny vázat protějščí záporně nabitě (20 mol% fosfatidylserin - PS + 80 mol% fosfatidylcholin - PC) membrány. Tento process je reverzibilní a závislý na koncentraci Ca^{2+} . Na molekulární úrovni byla identifikována tři různá vazebná místa: karbonylové skupiny,

fosfátové skupiny a karboxyly molekul phosphatidylserinu. Vazba vápenatých iontů na jednotlivá místa je ovlivněna jejich koncentrací, což může hrát důležitou roli v signalizačních drahách, kde je koncentrace Ca^{2+} klíčovým faktorem. Vazba vápenatých iontů snižuje hydrataci a mobilitu fosfolipidových membrán, stejně jako laterální vzdálenost mezi jednotlivými lipidovými molekulami. Tyto lokální změny konformace membrány mohou mít vliv na průběh dějů spojených s mezimembránovými i protein-lipidovými interakcemi. Dále bylo ukázáno, že záporně nabitě vnitřní vrstvy plasmatických membrán slouží jako účinné Ca^{2+} pufry při vzrůstu koncentrace vápenatých iontů v cytosolu.

4. Mechanismus fúze vesikul: konfokální mikroskop v akci

4.1 Techniky využívající konfokální mikroskop

Fluorescenční korelační spektroskopie (FCS)¹⁷⁻¹⁹

Metoda FCS je založena na zaznamenávání fluktuací fluorescenčního signálu, který pochází z molekul fluoroforů procházejících velmi malým detekčním objemem. Statistická analýza intensity fluorescence v čase t , $I(t)$, a intensity v čase $t+T$, $I(t+T)$, poskytne autokorelační funkci (ACF), která obsahuje informaci o: i) průměrném počtu molekul vyskytujících se v detekčním objemu a ii) průměrném čase, který v něm setrvávají. Pokud známe velikost detekčního objemu, lze jednoduše spočítat i) koncentraci fluoroforů a ii) jejich difuzní koeficient. Metoda Z-scan FCS^{20,21} umožňuje určit oba zmiňované parametry v obřích lipidových vesikulách (GUVs) bez použití externí kalibrace.

Försterův rezonanční přenos energie (FRET)^{17,22}

Försterův rezonanční přenos energie je proces nezářivého přenosu energie mezi dvěma molekulami, které i) se vyskytují dostatečně blízko u sebe a ii) jejich emisní (donor) a excitační (akceptor) spektra se překrývají. Efektivní FRET nastává mezi molekulami vzdálenými v rozmezí 1 až 10 nm, tedy rozměry odpovídající velikosti proteinů či šířce biologických membrán. Proto je tato metoda vhodná ke studiu vzdáleností v biologických systémech, jako jsou například interakce mezi membránou/proteiny/ligandy nebo agregace molekul. V praxi se FRET určuje měřením doby života molekuly donoru; ve chvíli, kdy je v blízkosti donoru i akceptor, doba jeho života v důsledku FRETu poklesne.

4.2 Komplementární lipopeptidy CP₁₂E₄ a CP₁₂K₄ indukují fúzi lipidových membrán: molekulární mechanismus jejich interakce s membránou

Modelový systém inspirovaný mechanismem SNARE proteinů, které jsou klíčovým hráčem při fúzi membrán v živých organismech, byl vyvinutý a optimalizovaný ve skupině Alexandera Krose.²³ Tento model je tvořen dvěma komplementárními molekulami lipopeptidů, CP₁₂K₄ a CP₁₂E₄, které spolu interagují skrz své peptidové části E₄/K₄ tvořící takzvaný „coiled-coil“ motiv. Pomocí této vazby jsou membrány rozpoznány, přiblíženy do těsného kontaktu, čímž je umožněna fúze.²⁴ Pro vývoj účinného a specifického systému použitelného *in vivo*, například pro cílený transport léčiv, je nezbytné porozumět mechanismu fúze lipidových membrán. Za předpokladu, že spouštěčem membránové fúze je coiled-coil interakce dvou komplementárních peptidových řetězců E₄ a K₄, účinnost tohoto procesu může být ovlivněna, krom jiného, interakcí mezi i) (lipo)peptidem a membránou a ii) peptidovými řetězci jednotlivých lipopeptidů inkorporovaných v membráně, tzn. homoagregací. Použitím metod fluorescenční korelační spektroskopie a försterova rezonančního přenosu energie byl popsán mechanismus interakce lipopeptidů s membránou. V dalším kroku se práce zabývala mechanismem interakce lipopeptidu CP₁₂E₄ inkorporovaného v membráně a peptidu K₄ přidávaného z roztoku, tedy fází která bezprostředně předchází fúzi membrán.

Lipopeptidy CP₁₂E₄ a CP₁₂K₄ se po inkorporaci do membrány (DOPC/DOPE/Chol 50/25/25) chovají velmi rozdílně díky lišícím se peptidovým řetězcům. Zatímco peptidová část CP₁₂K₄ má tendenci interagovat s membránou a zanořovat se do oblasti fosfolipidových hlaviček, řetězec E₄ je exponován do vodné fáze. Dále bylo ukázáno, že vlivem CP₁₂K₄ membrána kondenzuje a při vyšších koncentracích (~ 2 mol%) CP₁₂K₄ v membráně agreguje. Oba tyto děje mají za následek zpomalení dynamiky membrány. Nic z toho nebylo pozorováno pro CP₁₂E₄. Agregace lipopeptidu i zanoření jeho peptidového řetězce může vést ke snížení účinnosti fúze, vzhledem ke snížení počtu K₄ řetězců volných pro CP₁₂E₄ - CP₁₂K₄ coiled coil interakci. Pokus s přidavkem detergentu Tween 20 k roztoku CP₁₂K₄ před jeho smícháním s vesikulami vedl k určitému usnadnění fúze vesikul²⁵, nikoliv však v důsledky potlačení agregace.

Afinita peptidu K₄ (bez lipidové kotvy) k membráně (DOPC/DOPE/Chol 50/25/25) obsahující lipopeptid CP₁₂E₄ je znatelně vyšší, ve srovnání s membránou bez CP₁₂E₄. Překvapivě nebyla pozorována přímá interakce mezi CP₁₂E₄ a K₄, tedy dříve zmiňovaný coiled coil motiv,

což naznačuje, že tato interakce je pouze přechodná. Ve chvíli, kdy se peptid K₄ díky coiled coil interakci dostane do blízkého kontaktu s membránou, interakce K₄-membrána převáží nad vazbou E₄-K₄. Lze tedy spekulovat, že vlastní fúze bude probíhat podobně; tedy v prvním kroku dojde k přiblížení membrán díky coiled coil interakci, zásadním krokem pro samotnou fúzi potom může být až interakce CP₁₂K₄ s membránou.

5. Vznik pórů, vytvořených proteinem Bax, v membráně mitochondrií: zkouška průsaku fluorescenčního barviva

5.1 Zkoušky průsaku fluorescenčního barviva

Zkoušky průsaku fluorescenčního barviva, prováděné jak na velkých jednovrstvých vesikulách (LUVs), tak na obřích vesikulách (GUVs), jsou metody vhodné k detekci poruch v integritě membrány, jako je vznik pórů. Metoda používající LUVs je založena na schopnosti barviva calcein zhaset svou fluorescenci v koncentracích vyšších než 1mM.²⁶ Vesikuly, jejichž vnitřek obsahuje 35mM calcein, tedy vykazují při měření pouze nízkou intenzitu fluorescence. Pokud je membrána narušena, calcein uniká do okolního roztoku, ředí se a intenzita fluorescence roste. GUVs mají obvykle v průměru 10 – 100 μm a jsou tedy viditelné pod mikroskopem. Membrána vesikuly je označena lipofiním barvivem a pufr obklopující vesikuly obsahuje spektrálně odlišné fluorescenční barvivo, čímž je umožněna separace fluorescenčního signálu. Průsak fluorescenčního barviva rozpuštěného v pufru lze pozorovat přímo, tzn. snímáním obrázků průřezů vesikul v XY rovině.

5.2 Oxidovaný fosfolipid PazePC usnadňuje tvorbu Bax pórů v modelových mitochondriálních membránách

Vnitřní apoptotická dráha je úzce spojena s vnější mitochondriální membránou. Proteiny Bcl-2 rodiny, které regulují tento proces, se zde setkávají a rozhodují o dalším osudu buňky, tzn. propustnosti mitochondriální membrány.^{27–29} Klíčovou molekulou pro vznik pórů je pro-apoptotický protein Bax, který se po aktivaci zanořuje do vnější mitochondriální membrány, inhibuje účinek anti-apoptotického Bcl-2 proteinu a tvoří póry.³⁰ Nedávno bylo zjištěno, že se oxidované fosfolipidy, vznikající působením reaktivních form kyslíku, mohou přímo účastnit mitochondriální apoptózy³¹ a že jejich přítomnost v modelových mitochondriálních membránách zvyšuje afinitu proteinu Bax k membráně.³²

Použitím metod průsaku fluorescenčního barviva bylo zjištěno, že protein Bax tvoří póry v modelových mitochondriálních membránách (PazePC/POPC/POPE/TOCL: $x/(43-x)/36/21$ mol% pro LUVs a $x/(54-x)/36/10$ mol% pro GUVs) a to bez jakékoliv předchozí aktivace. Přítomnost oxidovaného fosfolipidu PazePC tvorbu pórů usnadňuje, konkrétně zvyšuje rychlost unikajícího barviva, zatímco frakce proteklých vesikul se nemění. Tyto závěry poukazují na to, že póry vznikající v membránách s oxidovaným fosfolipidem jsou větší než v membránách nepoškozených oxidačním stresem. Schopnost proteinu Bax zvyšovat propustnost membrány je závislá jak na jeho koncentraci tak na množství PazePC v membráně. Dalším zásadním faktorem pro tvorbu pórů je přítomnost cardiolipinu, vesikuly bez obsahu tohoto lipidu nevykazovaly v přítomnosti proteinu Bax žádný průsak barviva. Velikost póru, a to v membráně obsahující PazePC i bez něj, není dostatečná k propagaci apoptotického signálu, tedy k vyjití cytochromu c do intracelulárního prostoru. V souladu s fluorescenčními experimenty metody NMR a kalorimetrie potvrdily, že PazePC narušuje organizaci membrány, čímž umožňuje proteinu Bax inkorporaci do membrány. Dále NMR studie ukázaly, že se molekula Baxu v přítomnosti membrány obsahující PazePC skládá z částí s omezenou pohyblivostí – zanořených do membrány a částí flexibilních – exponovaných do roztoku.

Přítomnost oxidovaného fosfolipidu v mitochondriální membráně pravděpodobně mění rovnováhu dvou forem proteinu Bax, volné v cytosolu a vázané v membráně, směrem k té membránové, čímž posunuje zdravou buňku blíž k pro-apoptotické. Pro vlastní průběh apoptózy je však nutný další tlak, nejspíš přítomnost ostatních pro-apoptotických členů Bcl-2 rodiny.

Charles University in Prague
Faculty of Science
Biochemistry Department

Ph.D. study program: Biochemistry
Summary of Ph.D. thesis



Membrane interactions studied by advanced fluorescent techniques: From ions to macromolecules

Šárka Pokorná

Supervisor: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.
Supervisor-consultant: Prof. Dr. Martin Hof, DSc.

Prague, 2016

Abstract

Advanced fluorescence techniques were used to explore three distinct topics concerning biological membrane and their interactions. Following thesis is according to the topic divided into three parts:

1) Ionic effects were studied employing time dependent fluorescence shift experiments and molecular dynamic simulations. Combination of these two approaches are suitable to reveal characteristic like mobility and hydration of particular bilayer segment, lipid packing or ion binding sites. Halide anions were reported to adsorb to the cationic lipid bilayer specifically, altering membrane mobility and organization. Changes in observed parameters follows Hofmeister order. Their effect is mediated either by direct ionic interaction (soft, polarizable ions) as well as via alteration of water structure (hard, non-polarizable ions) in proximity of ion molecule. Further, divalent calcium was shown to bind strongly to neutral and negatively charged lipid bilayers. Several types of binding sites depending on calcium concentration were identified.

2) Two complementary lipopeptides, CPK and CPE, incorporated into distinct lipid bilayers serve as a minimal model inducing membrane fusion. Effectiveness of fusion event might be influenced by lipopeptide-membrane and lipopeptide-lipopeptide interaction. To reveal molecular mechanism of such interactions confocal microscopic techniques, FCS and FRET, were employed. The two molecules were found to behave in strikingly different manner. While CPE incorporates homogeneously, CPK compress the bilayer, forms clusters and the peptide K has the tendency to snorkel into membrane headgroup region. Understanding the molecular mechanism is important for designing effective model for *in vivo* applications, like drug delivery.

3) Intrinsic apoptotic pathway is tightly connected with mitochondrial membrane. Life or death decision there is controlled by Bcl-2 protein family. Oxidized phospholipids (OxPLs) generated in the mitochondrial membrane during oxidative stress directly affect the onset and progression of mitochondria-mediated apoptosis. Bax (pro-apoptotic member of Bcl-2 family) pore forming activity in mitochondria like model vesicles doped with oxidized phospholipid PazePC was followed using leakage assays. It was shown that Bax-induced leakage, especially its rate, increased with the vesicles' PazePC content. Although the size of Bax pores is not sufficient for apoptosis progression.

1. Introduction

Biological membranes circumscribe the cells and organelles in living organisms, thus ensuring their organization and maintaining the non-equilibrium state existence between the two segregated environments. Membranes don't play only passive role separating the interior and exterior space; they actively participate on cell/organelle communication with outside environment, ensure the material exchange or provide the platforms for energy production. All these processes are maintained via membrane interactions.

The backbone of a membrane is formed by lipid molecules embedding membrane proteins. Lipid bilayer organization is maintained via hydrophobic effect; amphiphilic lipid molecules orient its hydrophobic fatty acid chains towards the membrane interior, while its hydrophilic headgroups are exposed to the water phase. Membrane proteins are similarly composed of hydrophobic-transmembrane and hydrophilic domains. Using words of Singer and Nicholson¹, who proposed their famous fluid mosaic model in 1972¹, membrane can be described as two-dimensional fluid, where relatively free diffusion of all molecules is enabled.

Real cell membranes are very complex systems and their composition is impossible to control without destroying them. Therefore, model membranes, created artificially, are often used instead. Free standing lipid bilayers in form of vesicles are distinguished according to their size. Large unilamellar vesicles (LUVs) have cca 50-1000 nm in diameter and are suitable for bulk experiments. Giant unilamellar vesicles (GUVs) resembles the size of cells, $d = 10 - 100 \mu\text{m}$, and are visible under the microscope, thus enable the single vesicle measurements.

Fluorescent methods, despite the need of labelling, are widely developed and used in biological/biochemical/biophysical research mainly due to their high sensitivity and low invasiveness. Two years ago development in super-resolution fluorescence microscopy was awarded with Nobel prize. Advanced fluorescence techniques are useful tool to gain bulk information, like overall membrane mobility or hydration, as well as detailed molecular picture describing aggregation phenomena or distances between individual molecules.

The current study would like to present three distinct topics concerning the membranes and their interactions with other molecules. Though the topics as well as the respective methods are pretty diverse, short general introduction is followed by the text divided into three parts, each involving description of methods, introduction to the particular topic, and overview of results with discussion.

2. Aims of the study

Present study would like to contribute to the better understanding of processes connected with biological membranes. From the plethora of such events, three distinct topics were explored within this thesis and are presented as follows:

1) Effect of various ions on membrane mobility and hydration was studied. Together with MD simulations present work would like to explain how individual ions interact with lipid bilayers, where do they bind and how it affects the bilayer organization.

2) Minimal system, comprising two complementary lipopeptides, inducing effective fusion was characterized in terms of molecular mechanism of lipopeptide – membrane and lipopeptide – lipopeptide interactions. Both types of interactions might influence the fusion efficiency. Better understanding of the process might help in designing in vivo applications, e.g. drug delivery.

3) Intrinsic apoptotic pathway is tightly connected with mitochondrial membrane, where Bcl-2 protein family controls life or death decision. Influence of oxidized phospholipids (lipids modified by ROS action) on the crucial step, Bcl-2 member Bax disintegration of mitochondrial membrane, of apoptosis was investigated. Using leakage assay, impact of oxidized phospholipids on Bax pore formation activity was followed.

3. Ionic effects at membrane/water interface explored by time dependent fluorescence shifts (TDFS)

3.1 Time dependent fluorescence shift method determines membrane mobility and hydration at defined bilayer depth²

Fluorescent polarity sensitive probes used in time dependent fluorescence shift (TDFS) measurements reports on the polarity and viscosity of their environment. These molecules possess a large dipole moment and their fluorescence is influenced by the interaction with the surrounding molecules. Lipid bilayers exhibit a large polarity gradient along the bilayer normal, going from well hydrated headgroup region to non-polar bilayer center. Therefore, precise location of the probes within the membrane is crucial. Laurdan probe is embedded at the carbonyl level of the lipid bilayer³, Dtmac is located closer to the lipid/water interface⁴. Both probes monitor the headgroup region, where the water is H-bonded to lipid molecules and therefore the polarity and viscosity corresponds to hydration and overall membrane mobility, respectively. The first characteristic is represented by total spectral shift ($\Delta\nu$) the later by mean solvent relaxation time (τ).

3.2 Interactions of monovalent salts with cationic lipid bilayers (paper I, paper II)

Ionic interactions with biomolecules are very often related to Hofmeister effect. This phenomenon was described more than 100 years ago by Franz Hofmeister, who ordered the ions according to their ability to precipitate the protein from a solution^{5,6}, and till now is not fully understood. Initial explanation that the ion alter the water structure was disapproved recently by the observation the ions are not able to influence the water structure beyond its first hydration shell.^{7,8}

Cationic lipids are not a common component of biological membranes. Synthetic cationic lipids are, often in the mixture with zwitterionic – helper lipid⁹, however, successfully used in gene delivery. They are associated with a nucleic acid polyanion to protect it and facilitate its transport into the cell.^{10,11} There is no doubt that in the complexation of the DNA with cationic/zwitterionic lipids, the presence of the counterions, as well as the salt solutions, in which the process occurs, cannot be ignored.¹²

Ionic effects were studied on DOPC large unilamellar vesicles (LUVs), to amplify the anionic effect positively charged DOTAP was added. NaCl and KCl, biologically abundant salts, were shown to slow down the mobility of neutral and positively charged membranes. MD reveals that the first is due to binding of cations to bilayer headgroup region, while the latter is a result of chloride forming compensating electrostatic layer close to the DOTAP headgroup.

Effect of ClO_4^- , Br^- , Cl^- , and F^- was shown to follow the Hofmeister series, with chloride action being the weakest, i.e. the most similar to pure water. Perchlorate and bromide adsorb deep in the headgroup region of positively charged membranes, cluster the lipid molecules and slow down the membrane mobility significantly. Moreover, bromide ions in purely cationic bilayers were shown by MD to form hydrophilic and hydrophobic patches at the bilayer surface. On the other hand, fluoride doesn't adsorb to the headgroup region. Due to the strong affinity to water, F^- anions, when attracted close to the cationic bilayer, disturb its structure by breaking the network of hydrogen bonds created by molecules of lipids and water, which leads to more fluid bilayer. To conclude, while soft, polarizable anions like ClO_4^- and Br^- affect the positively charged bilayer directly, i.e. bind and bridge the lipid molecules, hard, non-polarizable ions like F^- act indirectly via water structure.

3.3 The complex nature of calcium cation interactions with zwitterionic and anionic phospholipid membranes (paper III)

Understanding interactions of calcium with lipid membranes at the molecular level is of great importance in light of their involvement in calcium signaling¹³, association of proteins with cellular membranes^{14,15}, and membrane fusion¹⁶. Employing a combination of spectroscopic methods with atomistic molecular dynamics simulations these interactions were quantified in detail.

Dynamic light scattering (DLS) reveals the ability of calcium ions to bridge the opposing negatively charged (20 mol% PS + 80 mol% PC) lipid bilayers. This process is concentration dependent and reversible. On the molecular level, three distinct binding sites for calcium ions were identified; carbonyl oxygens, phosphate groups and carboxylic moiety of PS. These sites are heterogeneous both from the point of view of binding affinity and their positioning in the membrane. The character of the calcium binding varies with Ca^{2+} concentration, which might be important as Ca^{2+} concentration spikes occur along calcium signaling pathways. Strong binding of calcium significantly alters the membranes by means of reduction of their hydration, lipid

mobility, and lateral inter-lipid distance. Such local conformational membrane remodeling may play a significant role in modulation of lipid-protein interactions as well as membrane-membrane interactions. Moreover, it was shown that negatively charged inner leaflet of the plasma membrane can act as an effective calcium buffer upon calcium entering the cytosol.

4. Mechanism of vesicle fusion investigated using confocal microscope

4.1 Confocal fluorescence microscopy techniques

*Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)*¹⁷⁻¹⁹

FCS technique is based on recording the fluorescence signal fluctuations arising from fluorophores passing through small detection volume. Statistical analysis of fluorescence intensity in certain time $I(t)$ and the fluorescence intensity after certain lag time $I(t+T)$ provides autocorrelation function (ACF), which contains information about average: i) number of molecules and ii) their residence time within the detection volume. Provided that the size of detection volume is known, concentration of a fluorescent molecule (i) and its diffusion coefficient (ii) can be calculated. Z-scan FCS^{20,21} approach is ideal to determine both parameters in giant unilamellar vesicles (GUVs) without need of external calibration.

Förster resonance energy transfer (FRET)^{17,22}

Förster resonance energy transfer (FRET) is a process of radiationless energy transfer between two molecules located sufficiently close to each other and possessing overlap of their emission (donor) and absorption (acceptor) spectra. The distances at which efficient FRET occurs are within the range of 1-10 nm, i.e. the size of proteins or thickness of a membrane, and therefore suitable for determining distances in biological systems. FRET measurements can also be applied on such topics as protein-protein/ligand/membrane interactions or aggregation phenomena. Practically, in FRET experiments lifetime of donor molecules is recorded; once the acceptor molecule is in the donor vicinity, lifetime of donor decreases due to energy transfer.

4.2 Complementary lipopeptides CPE and CPK induce fusion of lipid membranes: molecular mechanism of lipopeptide – membrane interaction

(in preparation)

Model system inspired by molecular recognition of native SNARE proteins was developed and optimized by the group of Alexander Kros.²³ This system comprises of two complementary lipopeptide molecules CP₁₂K₄ and CP₁₂E₄ interacting with each other via coiled-coil of their E/K peptides, bringing the two membranes in the close contact and inducing effective fusion *in vitro*.²⁴ Designing of an efficient and specific system, which might be useful for *in vivo* application, e.g. drug delivery, requires a good understanding of molecular mechanism behind the fusion event. Assuming the fusion is triggered by coiled coil interaction of two complementary peptides E₄ and K₄, the efficiency of this process might be, among others, influenced by i) (lipo)peptide – membrane interaction and ii) homoclustering of lipopeptides incorporated in a membrane. In the present study these two phenomena are approached using fluorescent confocal microscopic techniques. Further, mechanism of the initial step of the fusion event is foreshadowed, i.e. the interaction of membrane incorporated CP₁₂E₄ with peptide K₄.

Strikingly different behavior of the CP₁₂E₄ and CP₁₂K₄ within the lipid membrane (DOPC/DOPE/Chol 50/25/25) was observed, originated from their distinct peptide moiety. While K₄ peptide has the tendency to interact with the lipids and snorkel into the membrane/water interface, peptide E₄ is exposed to the water phase. Moreover, CPK was shown to laterally compress the lipid bilayer and in higher (around 2 % of total lipid amount) form homoaggregates, thus hindering the mobility of lipid molecules. Nothing of that kind was seen for CP₁₂E₄. Both lipopeptide aggregation and peptide K₄ snorkeling might suppress the fusion efficiency as the amount of free K₄ for CP₁₂K₄ - CP₁₂E₄ coiled coil interaction is lowered. In the attempt to overcome this problem, the detergent Tween 20 was added to CP₁₂K₄ solution before lipopeptide incorporation into the vesicles. Although, it was shown the fusion efficiency increases in the presence of Tween 20²⁵, no cluster dissolving was observed.

Presence of CP₁₂E₄ in the DOPC/DOPE/Chol bilayer enhances significantly the K₄ peptide membrane adsorption. Surprisingly, no sign of direct coil-coiled interaction between CP₁₂E₄ and K₄ was measured. This indicates that, while the K₄ peptide is attracted close to the lipid surface by the CP₁₂E₄ presence, once it is there, K₄-membrane interaction outweighs the CP₁₂E₄ – K₄

interaction. Accordingly, the fusion event itself is probably maintained rather via CP₁₂K₄ - membrane interaction than by CP₁₂E₄ – CP₁₂K₄ coil-coiled binding.

5. Fluorescence leakage assay reveals membrane pore formation by Bax protein

5.1 Fluorescence leakage assays

Fluorescence leakage assays employing either LUVs or GUVs are tools to detect disturbances in the membrane integrity, e.g. pore formation. LUVs entrap concentrated (35mM) and therefore self-quenched calcein fluorescein dye. Once the pores are formed, calcein is released, diluted and fluorescent intensity starts to increase. GUVs are large enough to be visible under a conventional microscope. Membrane of GUVs is visualized using lipophilic fluorescent probe and leakage of water soluble dye across the membrane is observed directly by scanning of GUVs' cross section in XY plane.

5.2 The oxidized phospholipid PazePC promotes Bax ability to induce pores in mitochondrial membranes (paper IV)

Intrinsic apoptotic pathway is tightly connected with mitochondrial outer membrane (MOM). Key regulator of this process is the Bcl-2 protein family whose members meet at the MOM and arbitrate a life or death - membrane permeabilization decision there.^{26–28} The main protein causing permeabilization is the apoptotic Bax protein which upon stress-induced activation translocate to the MOM, inhibits there the pro-survival Bcl-2 protein, and induces pore formation.²⁹ Recently it was found, that under oxidative stress conditions oxidized lipids can be generated that are directly involved in mitochondrial apoptosis.³⁰ Moreover, addition of oxidized phospholipids into MOM mimicking model lipid bilayer enhanced membrane affinity and partial penetration of full length Bax.³¹

Protein Bax is able to induce pore formation in mitochondria like model vesicles (PazePC/POPC/POPE/TOCL: x/(43-x)/36/21 mol% for LUVs and x/(54-x)/36/10 mol% for GUVs) without any previous activation. Presence of oxidized phospholipid PazePC, mimicking intracellular oxidative stress, promotes the ability of Bax to form pores. Upon oxidative stress the leakage rate is increased, while the fraction of the vesicles does not change significantly, which indicates the pores size growth. The ability of Bax to permeate the membrane is strongly

correlated with the amount of oxidized lipid and the concentration of Bax protein. Another crucial factor for pore formation is the cardiolipin, no leakage from vesicles without this lipid was observed after Bax addition. However, size of the pores in vesicles, either with or without PazePC, is not sufficient to promote the apoptotic signal, i.e. to release the cytochrome c to the cytosol. Accordingly, solid state NMR studies and calorimetric experiments on the lipid vesicles confirmed that OxPl incorporation disrupted the membrane's organization, enabling Bax to penetrate into the membrane. Moreover, it was shown Bax molecule comprise of dynamically restricted helical segments embedded in the membrane and highly flexible segments located outside or at the membrane surface.

It means that already in non-apoptotic cell, there has to be some part of Bax molecules inserted into the MOM and the equilibrium between bound and free protein is shifted to MOM inserted Bax upon the oxidative stress. Nevertheless, size of the pores is not sufficient for apoptotic signal progression and further apoptotic pressure, probably involving other pro-apoptotic Bcl-2 members, is needed to trigger the apoptosis.

References

1. Singer, S. J. & Nicolson, G. L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* (80-.). **175**, 720–731 (1972).
2. Pokorna, S., Olżyńska, A., Jurkiewicz, P. & Hof, M. in 141–159 (Springer Berlin Heidelberg, 2012). doi:10.1007/4243_2012_46
3. Jurkiewicz, P., Olżyńska, A., Langner, M. & Hof, M. Headgroup hydration and mobility of DOTAP/DOPC bilayers: A fluorescence solvent relaxation study. *Langmuir* **22**, 8741–8749 (2006).
4. Jurkiewicz, P., Sýkora, J., Olżyńska, A., Humpolíčková, J. & Hof, M. Solvent relaxation in phospholipid bilayers: Principles and recent applications. *J. Fluoresc.* **15**, 883–894 (2005).
5. Kunz, W., Henle, J. & Ninham, B. W. ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about the science of the effect of salts): Franz Hofmeister’s historical papers. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **9**, 19–37 (2004).
6. Hofmeister, F. Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Arch. für Exp. Pathol. und Pharmakologie* **25**, 1–30 (1888).
7. Omta, A. W., Kropman, M. F., Woutersen, S. & Bakker, H. J. Negligible effect of ions on the hydrogen-bond structure in liquid water. *Science* **301**, 347–9 (2003).
8. Wachter, W., Kunz, W., Buchner, R. & Hefter, G. Is there an anionic Hofmeister effect on water dynamics? Dielectric spectroscopy of aqueous solutions of NaBr, NaI, NaNO₃, NaClO₄, and NaSCN. *J. Phys. Chem. A* **109**, 8675–83 (2005).
9. Hui, S. W. *et al.* The role of helper lipids in cationic liposome-mediated gene transfer. *Biophys. J.* **71**, 590–9 (1996).
10. Regelin, A. E. *et al.* Biophysical and lipofection studies of DOTAP analogs. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1464**, 151–164 (2000).
11. Felgner, P. L. *et al.* Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 7413–7417 (1987).
12. Williamson, P. Role of Mono- and Divalent Cations in DNA Compaction Induced by polyamines and cationic surfactants studied by Time Correlated Single Photon Counting Fluorescence Correlation Spectroscopy. (2014).
13. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–29 (2003).
14. Lemmon, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 99–111 (2008).

15. Nielsen, R. D., Che, K., Gelb, M. H. & Robinson, B. H. A ruler for determining the position of proteins in membranes. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 6430–42 (2005).
16. Martens, S. & McMahon, H. T. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 543–56 (2008).
17. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. (Springer US, 2006). doi:10.1007/978-0-387-46312-4
18. Elson, E. L. & Magde, D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers* **13**, 1–27 (1974).
19. Ries, J. & Schwille, P. Fluorescence correlation spectroscopy. *Bioessays* **34**, 361–8 (2012).
20. Humpolícková, J. *et al.* Probing diffusion laws within cellular membranes by Z-scan fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.* **91**, L23–5 (2006).
21. Benda, A. *et al.* How To Determine Diffusion Coefficients in Planar Phospholipid Systems by Confocal Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Langmuir* **19**, 4120–4126 (2003).
22. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Phys.* **437**, 55–75 (1948).
23. Robson Marsden, H., Elbers, N. A., Bomans, P. H. H., Sommerdijk, N. A. J. M. & Kros, A. A reduced SNARE model for membrane fusion. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 2330–3 (2009).
24. Versluis, F. *et al.* In Situ Modification of Plain Liposomes with Lipidated Coiled Coil Forming Peptides Induces Membrane Fusion. (2013).
25. Lopez Mora, N. F. Coiled coil driven membrane fusion on GUV-LUV: biophysical model evaluated at physiological ionic strength conditions. (2016).
26. Garg, P., Nemec, K. N., Khaled, A. R. & Tatulian, S. a. Transmembrane pore formation by the carboxyl terminus of Bax protein. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1828**, 732–742 (2013).
27. Martinou, J.-C. & Youle, R. J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev. Cell* **21**, 92–101 (2011).
28. Leber, B., Lin, J. & Andrews, D. W. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis* **12**, 897–911 (2007).
29. Youle, R. J. & Strasser, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 47–59 (2008).
30. Westphal, D. *et al.* Apoptotic pore formation is associated with in-plane insertion of Bak or Bax central helices into the mitochondrial outer membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, E4076–E4085 (2014).
31. Fruhwirth, G. O., Loidl, A. & Hermetter, A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1772**, 718–736 (2007).
32. Wallgren, M., Lidman, M., Pham, Q. D., Cyprych, K. & Gröbner, G. The oxidized phospholipid PazePC modulates interactions between Bax and mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 2718–24 (2012).

Curriculum vitae

Personal details

Šárka Pokorná
Moldavská 9, Praha 10, 101 00
Czech Republic
E-mail: sarka.pokorna@jh-inst.cas.cz

Education

| | |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Since 9/2009 | PhD study: Charles university in Prague, Faculty of Science, Biochemistry J. Heyrovsky Institute of Physical Chemistry of the CAS, v. v. i. |
| 2002 – 2008 | Master study: Charles university in Prague, Faculty of Science, Biochemistry Diploma thesis: Influence of ions and non-aqueous solvents on the structure and stability of α -lactalbumin |

Employment

| | |
|-----------------|---------------------------------------------------|
| 1/2009 – 9/2009 | ENVISAN GEM a.s. Radiová 1285/7 10200 Praha |
|-----------------|---------------------------------------------------|

Scientific stays

2011 (dva týdny) Institute of Biomedical Engineering and Instrumentation; Wrocław University of Technology


2015 (dva týdny) Department of Molecular Immunology Institute of Biology III, Faculty of Biology BIOS Centre for Biological Signaling Studies, University of Freiburg

Meetings and conferences

Pokorna, S., Specific ion interaction with positively charged phospholipid bilayers, Student seminar (Institute of Physical Chemistry J. Heyrovského), Liblice (2011), Czech republic, Presentation.

Pokorna, S., Vojtiskova, A., Cwiklik, L., Jurkiewicz, P., Jungwirth, P. and Hof, M., Specific ion effect in charged lipid membranes: fluorescence and simulation, 5th Prague-Wrocław Seminar on Biophysics of Lipids, Praha (2011), Czech republic, Presentation.

Pokorna, S., Jurkiewicz, P., Cwiklik, L., Vazdar, M. and Hof, M., Interactions of monovalent salts with cationic lipid bilayers, Ion specific Hofmeister effects: Faraday discussion 160, Oxford (2012), United Kingdom, Presentation.

Pokorna, S., Jurkiewicz, P., Vazdar, M., Cwiklik, L., Jungwirth, P. and Hof, M., Specific ion effects at mixed cationic/zwitterionic lipid bilayers, 6th Wrocław-Prague seminar on biophysics of lipids, Wrocław (2013), Poland, Presentation. 

Pokorna, S., Sachl, R., Lidman, M., Dingeldein, A.P., Hof, M. and Grobner, G., The oxidized phospholipids modify pore forming activity of Bax protein in mitochondrial membrane, 10th European Biophysics Congress, Dresden (2015), Germany, Poster.

Pokorna, S., Sachl, R., Lidman, M., Dingeldein, A.P., Hof, M. and Grobner, G., The oxidized phospholipids modify pore forming activity of Bax protein in mitochondrial membrane, 14th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Würzburg (2015), Germany, Poster.

List of publications

Paper I - **Interactions of monovalent salts with cationic lipid bilayers:** *Pokorna, S., Jurkiewicz, P., Cwiklik, L., Vazdar, M. and Hof, M.*, Faraday Discuss., 160, 341-358, 2012

Paper II - **Does fluoride disrupt hydrogen bond network in cationic lipid bilayer? Time-dependent fluorescence shift of Laurdan and molecular dynamic simulations:** *Pokorna, S., Jurkiewicz, P., Vazdar, M., Cwiklik, L., Jungwirth, P. and Hof, M.*, J Chem Phys., 141(22), 22D516, 2014

Paper III - **The complex nature of calcium cation interactions with phospholipid bilayers:** *Melcrova A., Pokorna, S., Pullanchery, S., Kohagen, M., Jurkiewicz, P., Hof, M., Jungwirth, P., Cremer, P. and Cwiklik, L.*, submitted to Scientific reports

Paper IV - **The oxidized phospholipid PazePC promotes permeabilization of mitochondrial membranes by Bax:** *Lidman M*, Pokorná Š*, Dingeldein AP, Sparrman T, Wallgren M, Šachl R, Hof M, Gröbner G.*, Biochim Biophys Acta. 1858(6), 1288-97, 2016

**contributed equally*

Ostatní publikace:

Hydration and Mobility in Lipid Bilayers Probed by Time-Dependent Fluorescence Shift: *Pokorná, Š., Olżyńska, A., Jurkiewicz, P., Hof M.* In: Hof, M. (Ed.) Fluorescent Methods to Study Biological Membranes, 141-159, Heidelberg: Springer, 2013

Membrane activity of the pentaene macrolide didehydroroflomycoin in model lipid bilayers: *Koukalová, A., Pokorná, Š, Fišer, R., Kopecký V., Jr., Humpolíčková, J., Černý,* J.BBA - Biomembranes, 1848(2), 444—452, 2015